

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 772 788**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **97 16138**

⑤1 Int Cl<sup>6</sup> : C 12 P 7/18, C 12 N 1/19, 15/53

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 19.12.97.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 25.06.99 Bulletin 99/25.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *ROQUETTE FRERES Societe ano-  
nyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : SANIEZ MARIE HELENE, HEYSEN  
ARNAUD, NAIRI SAMIRA et DEFRETIN SOPHIE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤4 PROCÉDE POUR ACCROITRE LA PRODUCTION DE CERTAINS POLYOLS PAR UNE SOUCHE  
OSMOTOLÉRANTE.

⑤7 La présente invention a pour objet un procédé pour  
accroître la production d'un polyol par une souche de levure  
osmotolérante, ledit polyol étant choisi dans le groupe cons-  
titué par le ribitol, l'arabitol et l'érythritol, en stimulant le flux  
carboné dans la voie métabolique oxydative du cycle des  
pentoses phosphates de ladite souche, caractérisé par le  
fait :

- que l'on amplifie l'activité enzymatique de la première  
enzyme de ladite voie métabolique, à savoir la glucose-6-  
phosphate déshydrogénase,
- que l'on cultive la souche obtenue sur un milieu de fer-  
mentation contenant une source carbonée directement as-  
similable et
- que l'on récupère le polyol ainsi produit.

FR 2 772 788 - A1



PROCEDE POUR ACCROÎTRE LA PRODUCTION DE CERTAINS POLYOLS  
PAR UNE SOUCHE OSMOTOLERANTE

5           La présente invention a pour objet un procédé permettant d'accroître la production de certains polyols par une souche de levure osmotolérante cultivée sur un milieu contenant une source carbonée directement assimilable.

          Elle a également pour objet une souche osmotolérante dont la mise en culture sur un milieu contenant une  
10       source carbonée directement assimilable permet d'accroître la production de polyols.

          Elle a en outre pour objet un fragment d'ADN qui correspond à une partie de la séquence du gène codant pour  
15       la glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Yamadazyma ohmeri* (auparavant appelée *Pichia ohmeri*).

          Dans le contexte de la présente invention, on entend par "source carbonée directement assimilable", une source carbonée qui, une fois assimilée par le micro-  
20       organisme, conduit à la production de polyols. Des exemples de telles sources carbonées sont le glucose, le D-galactose, le L-sorbose, le D-ribose, le D-xylose, le D-arabinose, le L-arabinose, le D-ribulose, le D-xylulose, le saccharose, le glycérol, le D-sorbitol, le D-mannitol,  
25       le galactitol, le myo-inositol, l'éthanol, l'amidon, l'inuline, le D-gluconate, le lactate, le succinate, le citrate, le fructose, ainsi que leurs mélanges.

          De préférence, ces sources carbonées sont choisies dans le groupe comprenant le glucose, le D-galactose, le  
30       L-sorbose, le saccharose, le glycérol, l'amidon et le fructose.

          La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) catalyse la première étape de la voie oxydative du cycle des

pentoses phosphates. Lors de cette réaction, le glucose-6-phosphate est oxydé en 6-phospho-glucono lactone avec réduction concomitante du coenzyme Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide-Phosphate (NADP) en NADPH.

5           En effet, les pyridine-nucléotides, Nicotinamide-Adénine-Dinucléotide (NAD) et NADP, sont largement utilisés comme coenzymes par les déshydrogénases. Ils transportent des ions hydrure (2 électrons et 1 H<sup>+</sup>). Le NADP réduit constitue l'agent de réduction le plus important dans  
10 les biosynthèses.

Les G6PDH existent aussi bien chez les microorganismes que chez les animaux et les plantes. Elles peuvent être classées en trois groupes en fonction de leur spécificité pour les coenzymes de type NAD ou NADP.

15           Ainsi, les enzymes du premier groupe réagissent exclusivement avec le NADP. On peut citer comme exemple la G6PDH d'*Escherichia coli*. Cependant, certaines enzymes appartenant au premier groupe réagissent faiblement avec le NAD.

20           Le deuxième groupe comprend les enzymes de l'espèce animale. Ces enzymes sont NADP dépendantes, mais elles présentent une activité nette, quoique faible, avec le NAD.

25           Les enzymes appartenant au troisième groupe n'ont pas de préférence de spécificité pour les cofacteurs, réagissant aussi bien en présence du NADP qu'en présence du NAD. A titre d'exemples on peut citer les G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* et de *Pseudomonas aeruginosa*.

30           Les gènes codants pour les G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicus* et *Bacillus* ont été isolés et séquencés. Ces travaux font respectivement l'objet des brevets US 5 244 796, US 5 229 286 et FR 2 641 285.

Les brevets cités ci-dessus décrivent l'isolement et le clonage des gènes dans le but de mettre à disposition un procédé de préparation de la G6PDH.

En effet, les applications de la G6PDH se trouvent  
5 dans le domaine du diagnostic, notamment pour le dosage de la créatine kinase en cas d'infarctus du myocarde. Il est donc essentiel de disposer d'une enzyme stable thermiquement et stable au cours du temps. Une telle enzyme a été obtenue par la voie du génie génétique dans les brevets  
10 cités ci-dessus.

La finalité suivie dans le cadre de la présente invention est tout à fait différente. L'originalité de la présente invention réside dans le fait d'utiliser la stimulation de l'expression de la G6PDH homologue d'une le-  
15 vure, enzyme du premier groupe précédemment décrit, pour amplifier les voies métaboliques oxydatives conduisant aux pentoses phosphates, permettant ainsi la production de certains polyols, en l'occurrence l'arabitol, l'érythritol et le ribitol. L'augmentation du pouvoir réducteur en  
20 NADPH, concomitant à la stimulation de la G6PDH, sera mis à profit pour la réduction des précurseurs de l'arabitol et de l'érythritol.

Les polyols sont des sucres alcools. La plupart d'entre eux sont produits industriellement car leurs do-  
25 maines d'applications sont extrêmement nombreux.

Ils sont utilisés notamment pour la stabilisation des enzymes, en améliorant leur thermostabilité et leur stabilité dans les solvants aqueux ou organiques, pour la conservation par lyophilisation ou la cryoprotection, et  
30 pour l'encapsulation.

Les polyols trouvent également des applications dans le domaine agro-alimentaire compte tenu de leurs propriétés acariogènes et de leur moindre caloricité.

Ils sont aussi utilisés en cosmétologie ou en pharmacie, notamment en ce qui concerne les soins cutanés, compte tenu de leur haut pouvoir émollient et de leurs propriétés inhibitrices de croissance, propriétés dues au fait qu'ils constituent des sources carbonées difficilement assimilables.

Un certain nombre de micro-organismes, notamment des levures osmotolérantes, produisent naturellement des polyols. Ces derniers participent à l'équilibre osmotique, agissent en tant que composés carbonés de réserve, et contribuent à l'équilibre red-ox des micro-organismes qui les produisent.

Les levures osmotolérantes présentent ainsi de nombreuses potentialités industrielles. Sous certaines conditions elles peuvent produire de l'éthanol. En fonction des pressions osmotiques qu'on leur impose, et en présence de sels, elles produisent du glycérol. En présence d'une forte densité en sucres, tel que le glucose, elles produisent de l'érythritol, du mannitol, ou de l'arabitol.

*Y. ohmeri* est une levure osmotolérante (n° de dépôt ATCC 20209, dans The American Type Culture Collection). Elle est donc capable de se développer dans un environnement où la pression osmotique est élevée. En réponse à un choc osmotique, *Y. ohmeri* produit des polyols qui sont des osmolytes aptes à contrebalancer l'osmolarité du milieu externe. La nature et la quantité de polyols synthétisés dépendent, entre autres facteurs, des conditions de culture. Ainsi, sur un milieu contenant du glucose, *Y. ohmeri* produit du D-arabitol. Ceci a été démontré par les travaux de Onishi et al. (Advances in Food Research, 12, 53).

Les voies métaboliques impliquées dans la production de l'arabitol chez *Y. ohmeri* sont semblables à celles de *Zygosaccharomyces cerevisiae*, *Z. melli* et *Z. rouxii*. En 1968, Spencer a proposé des schémas de voies métaboliques dans les *Zygosaccharomyces* (Prog. Ind. Microbiol., 7, 1). La Société Demanderesse a réalisé un travail similaire en ce qui concerne les voies métaboliques oxydatives des pentoses phosphates dans *Y. ohmeri*, le résultat étant schématisé dans la Figure 1.

Pour Spencer et également pour Onishi, ainsi que pour l'homme du métier considérant le schéma des pentoses phosphates, la transcétolase, enzyme qui catalyse un certain nombre de réarrangements du squelette carboné des métabolites, était considérée comme l'enzyme clef en ce qui concerne la production de polyols par des souches de levure.

Or, la Société Demanderesse a réussi à mettre en évidence que, de façon tout à fait surprenante et inattendue, l'amplification de la première enzyme de la voie oxydative du cycle des pentoses phosphates, à savoir la G6PDH, conduisait à une augmentation des rendements en polyols dans une levure osmotolérante.

En effet, et contrairement à toute attente, les travaux effectués par la Société Demanderesse ont montré que c'est la G6PDH (et non pas la transcétolase) qui est l'enzyme clef, responsable de la biosynthèse des polyols puisque c'est elle qui favorise le déplacement du flux carboné vers le cycle des pentoses phosphates au détriment de la glycolyse.

L'amplification de cette enzyme favorise également un apport supplémentaire de cofacteurs NADPH pouvant être mis en œuvre pour la réduction du ribulose en arabitol et de l'érythrose en érythritol.

La présente invention concerne donc un procédé pour accroître la production d'un polyol par une souche osmotolérante, ledit polyol étant choisi dans le groupe constitué par le ribitol, l'arabitol et l'érythritol, en  
5 stimulant le flux carboné dans la voie métabolique oxydative du cycle des pentoses phosphates dans ladite souche. Ce procédé est caractérisé par le fait que l'on amplifie l'activité enzymatique de la première enzyme de ladite voie métabolique, à savoir la glucose-6-phosphate déshydrogénase, que l'on cultive ladite souche sur un milieu de  
10 fermentation contenant une source carbonée directement assimilable, et que l'on récupère le polyol ainsi obtenu.

Dans le contexte de la présente invention l'activité "amplifiée" de la G6PDH peut être obtenue par  
15 des moyens divers.

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, l'activité de la G6PDH est amplifiée en intégrant une ou plusieurs copies du gène codant pour la G6PDH dans la souche et/ou en remplaçant le promoteur naturel de  
20 la G6PDH par un promoteur fort. On peut citer comme exemples le promoteur de la ribulose réductase NADPH-spécifique, le promoteur de l'alcool déshydrogénase (ADC1), le promoteur du gène GAL1, les promoteurs des gènes de la glycolyse (chez *S. cerevisiae* ou souches apparentées), et le promoteur du gène de la phosphoglycerol kinase (PGK). De préférence, on utilise le promoteur de la  
25 ribulose-réductase NADPH-spécifique.

La souche osmotolérante peut être choisie dans le groupe comprenant les souches de *Y. ohmeri*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida polymorpha* et *Torulopsis candida*, ou  
30 toute autre souche capable de produire des quantités significatives de D-arabitol à partir de glucose. De préférence, cette souche est *Y. ohmeri*.

Les conditions de culture préférées sont les suivantes :

- température comprise entre environ 25 et environ 40°C, de préférence entre environ 30 et 38°C,
- 5        - pH compris entre environ 3 et environ 7, de préférence entre environ 5 et environ 6, et
- teneur en source carbonée directement assimilable dans le milieu de fermentation comprise entre environ 100 et environ 600 g/l, de préférence entre environ 150 et environ 400 g/l.

10        Selon un mode préférentiel de réalisation du procédé conforme à l'invention, on ajoute une étape où on élimine ou réduit sensiblement l'activité enzymatique de la ribulose réductase NADPH spécifique, favorisant ainsi la production du ribitol.

De façon avantageuse, on effectue cette étape en délétant le gène codant pour la ribulose réductase NADPH spécifique.

20        Selon un autre mode préférentiel de réalisation du procédé conforme à l'invention, on ajoute une étape où on élimine ou on réduit sensiblement les activités enzymatiques des ribuloses réductases NADPH et NADH spécifiques, favorisant ainsi la production de l'érythritol.

25        De façon avantageuse, cette étape est effectuée en délétant les gènes codants pour les ribuloses réductases NADPH et NADH spécifiques. De préférence, on ajoute également une étape où on introduit une activité enzymatique du type érythrose réductase NADPH spécifique dans la souche. De façon avantageuse, on introduit un gène codant pour  
30        l'activité enzymatique du type érythrose réductase NADPH spécifique dans la souche.



L'invention concerne également une souche osmotolérante dans laquelle l'activité de la première enzyme de la voie oxydative du cycle des pentoses phosphates, c'est-à-dire la G6PDH, a été amplifiée.

5 L'invention concerne en outre une séquence d'ADN correspondant à une partie du gène codant pour la G6PDH de *Y. ohmeri*. Cette séquence ADN, ainsi que la séquence d'acides aminés déduite, est donnée sur la Figure 2.

L'invention pourra être mieux comprise à l'aide  
10 des exemples non-limitatifs décrits ci-dessous.

EXEMPLE 1 : Isolement et clonage du gène codant pour la G6PDH de *Yamadazyma ohmeri*

15 Des oligonucléotides amorces pour des réactions de polymérisation en chaînes (PCR) ont été synthétisées à partir des régions conservées des séquences peptidiques de plusieurs G6PDH connues.

Les couples d'amorces suivants (séquences dégénérées) ont été utilisés dans des réactions PCR selon la méthode décrite dans *Current Protocols in Molecular Biology* (première édition, 1987, Wiley Interscience), sur les clones plasmidiques d'une banque génomique de *Y. ohmeri* :

25 GPD2 : 5' AG[A,G]TCGTTCTGCATCACGTC 3'  
GPD4 : 5' GAYCAYTAYYTKGGYAARGA 3'  
GPD5 : 5' GAWBACVACVCCVTCCCA 3'

30 cycles ont été réalisés sur un appareil de type  
30 Thermocycler Perkin Elmer 7200, en suivant le profil de température ci-dessous :

- dénaturation pendant 30 secondes à 94°C,

- hybridation pendant 30 secondes à 50°C,
- polymérisation pendant une minute à 72°C.

Les fragments d'ADN amplifiés ont été ensuite analysés par séquençage. La méthode suivie était celle des  
5 terminaisons de chaînes de SANGER, décrite dans l'ouvrage précité.

La séquence nucléotidique du fragment GPD42 (issu du couple d'amorces GPD2 et GPD4), traduite en acides aminés et comparée à la séquence peptidique de la G6PDH de *S. cerevisiae* a révélé une homologie de 70% (Fig. 3). Ce  
10 fragment d'ADN a donc été utilisé comme sonde, afin d'isoler le gène complet de la G6PDH à partir d'un des clones plasmidiques de la banque d'ADN génomique de *Y. ohmeri*.

15 Un vecteur plasmidique portant un insert de 6700 paires de bases a été isolé par la technique du Southern Blot, en appliquant les protocoles décrits dans l'ouvrage précité.

La localisation de la phase ouverte de lecture a  
20 permis de réduire cet insert à la taille de 3500 pb, grâce aux sites de restriction EcoRI. Les conditions de digestion enzymatique étaient les suivantes : 37°C, pH 7,5 pendant 1 heure en tampon NaCl 50mM, Tris HCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, Triton x 100 0,025%. Ce fragment de restriction a  
25 ensuite été placé dans un vecteur plasmidique réplcatif propre à *Y. ohmeri*, ce vecteur renfermant une origine de replication propre homologue (élément ARS de *Y. ohmeri*) et le gène *leu2* de *Y. ohmeri*.

Le plasmide résultant, poGPD4 dont la carte de  
30 restriction est montrée sur la Figure 4, a ensuite été ré-introduit par électroporation dans la souche hôte auxotro-

phe pour la leucine (souche YoLeu-, obtenue par mutagenèse UV). La souche transformée a été nommée YoGPD.

5 EXEMPLE 2 : Dosage des activités de la G6PDH dans la  
souche YoGPD

La souche transformée, YoGPD, a été mise en culture sur un milieu contenant du glucose (150 g/l), de l'extrait de levures (3 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/l) et  $\text{MgSO}_4$  (1  
10 g/l).

Les productions ont été réalisées dans des erlenmeyers et fermenteurs de 2 litres, à une température de 37°C et à un pH initial de 5,7.

Des cinétiques enzymatiques ont été effectuées sur  
15 l'activité totale de G6PDH exprimée par la souche transformée, en comparaison avec celle exprimée par la souche hôte auxotrophe pour la leucine (YoLeu-).

Le dosage des activités enzymatiques a été réalisé par incubation des extraits bruts acellulaires en présence  
20 de glucose-6-phosphate et du cofacteur NADP. La formation du cofacteur réduit (NADPH) a été suivie en notant la variation de l'absorbance à 340 nm, permettant ainsi de quantifier le niveau d'expression de la G6PDH.

25 Le tableau suivant illustre les résultats de dosage (exprimés en  $\mu\text{moles}$  de cofacteur réduit formés/min/mg de protéines totales).

Temps (heures)	YoLeu- AS (U/mg)	YoGPD AS (U/mg)	Facteur d'amplification
24	3	2.9	1
48	3	4.7	1.5
56	3	3.5	1.2
72	2.6	3.2	1.2
80	3	4.2	1.4
96	3	4.5	1.5

Ce taux d'expression peut être augmenté en rempla-  
 çant le promoteur propre du gène par des éléments de régu-  
 5 lation d'un autre promoteur de levure connu comme ayant  
 une meilleure efficacité dans cette levure hôte. On peut  
 citer comme exemple le promoteur de la Ribulose Réductase  
 NADPH-spécifique de *Y. ohmeri*.

10

**EXEMPLE 3 : Production d'arabitol par la mise en culture  
 de la souche YoGPD**

Le milieu de culture retenu pour la production en  
 erlenmeyers ou en fermenteurs est le même que celui décrit  
 15 dans l'exemple 2.

De la même façon que la souche hôte, la souche transformée YoGPD produit exclusivement de l'arabitol à partir du glucose. Cependant, si la souche de départ produit 55 g/l d'arabitol (soit un rendement pondéral de 55 % sur le glucose consommé), la souche transformée produit, dans les mêmes conditions, 65 g/l d'arabitol, soit un gain de rendement de 10 %.

L'augmentation de l'activité spécifique de la G6PDH entre la souche hôte et la souche transformée suffit donc à dévier les flux métaboliques (flux carboné et apport du pouvoir réducteur supplémentaire) pour optimiser la capacité de *Y. ohmeri* à produire des polyols par voie fermentaire.

15

#### Exemple 4 : Construction de la souche RR-GPD

La Société Demanderesse dispose d'une souche de *Y. Ohmeri* productrice de ribitol, souche obtenue par délétion chromosomique du gène de la ribulose réductase NADPH spécifique (tel que présenté dans la demande de brevet français n° 97 04506). Cette souche est également auxotrophe pour l'uracile.

Le gène codant pour l'activité enzymatique G6PDH a été prélevé du vecteur poGPD4 grâce aux sites Sall-NotI et réintroduit aux sites Sall-NotI du vecteur plig3 (carte de restriction fig. 5) renfermant une origine de replication propre homologue (élément ARS de *Y. Ohmeri*) et le gène URA 3 de *Y. ohmeri*.

Le plasmide résultant poGPD5 (carte de restriction fig. 6), a ensuite été réintroduit par électroporation dans la souche RR-URA- (souche obtenue par délétion chromosomique du gène URA 3 homologue tel que précisé dans la

demande de brevet précitée). La souche transformée a été nommée RR-GPD.

Exemple 5 : Production de ribitol par la mise en culture de la souche RR-GPD.

Le milieu de culture retenu pour la production dans des erlenmeyers et fermenteurs de 2 litres contient du glucose à 200 g/l, de la liqueur de corn steep à 60 g/l et du  $MgSO_4$  à 2 g/l.

De la même façon que la souche hôte, la souche transformée produit du ribitol à partir du glucose, avec un rendement de 30% en poids par rapport à la quantité de glucose consommé. Cependant, si la souche de départ produit de l'ordre de 4% de ribulose en plus du ribitol, la souche transformée en produit 10%, soit un gain en rendement de 6%.

En fin de fermentation, le moût a été filtré, décoloré sur noir, déminéralisé, concentré à 40% de matière sèche puis hydrogéné en présence de 5% de Nickel de Raney, à une pression de 50 bars et à une température de 100°C durant 3 heures. Le sirop hydrogéné obtenu contenait 89% de ribitol et 10% d'arabitol.

Par conséquent, le rendement final en ribitol a augmenté de 5% par rapport au rendement obtenu avec la souche non transformée, dans les mêmes conditions opératoires.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour accroître la production d'un polyol par une souche de levure osmotolérante, ledit polyol étant choisi dans le groupe constitué par le ribitol, l'arabitol et l'érythritol, en stimulant le flux carboné dans la voie métabolique oxydative du cycle des pentoses phosphates de ladite souche, caractérisé par le fait :

- que l'on amplifie l'activité enzymatique de la première enzyme de ladite voie métabolique, à savoir la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- que l'on cultive la souche obtenue sur un milieu de fermentation contenant une source carbonée directement assimilable et
- que l'on récupère le polyol ainsi produit.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on élimine ou que l'on réduit sensiblement l'activité enzymatique de la ribulose réductase NADPH spécifique, favorisant ainsi la production du ribitol.

3. Procédé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé par le fait que l'on élimine ou que l'on réduit sensiblement les activités enzymatiques des ribuloses réductases NADPH et NADH spécifiques, favorisant ainsi la production de l'érythritol.

4. Procédé selon la revendications 3, caractérisé par le fait que l'on introduit une activité enzymatique du type érythrose réductase NADPH spécifique dans la souche.

5. Souche osmotolérante, caractérisée par le fait que l'activité enzymatique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase est amplifiée dans ladite souche.

6. Souche osmotolérante selon la revendication 5, caractérisée par le fait qu'elle est choisie dans le groupe comprenant *Yamadazyma ohmeri*, *Zygosaccharomyces*

rouxii, *Candida polymorpha*, et *Torulopsis candida*, et de préférence parmi les souches de *Yamadazyma ohmeri*.

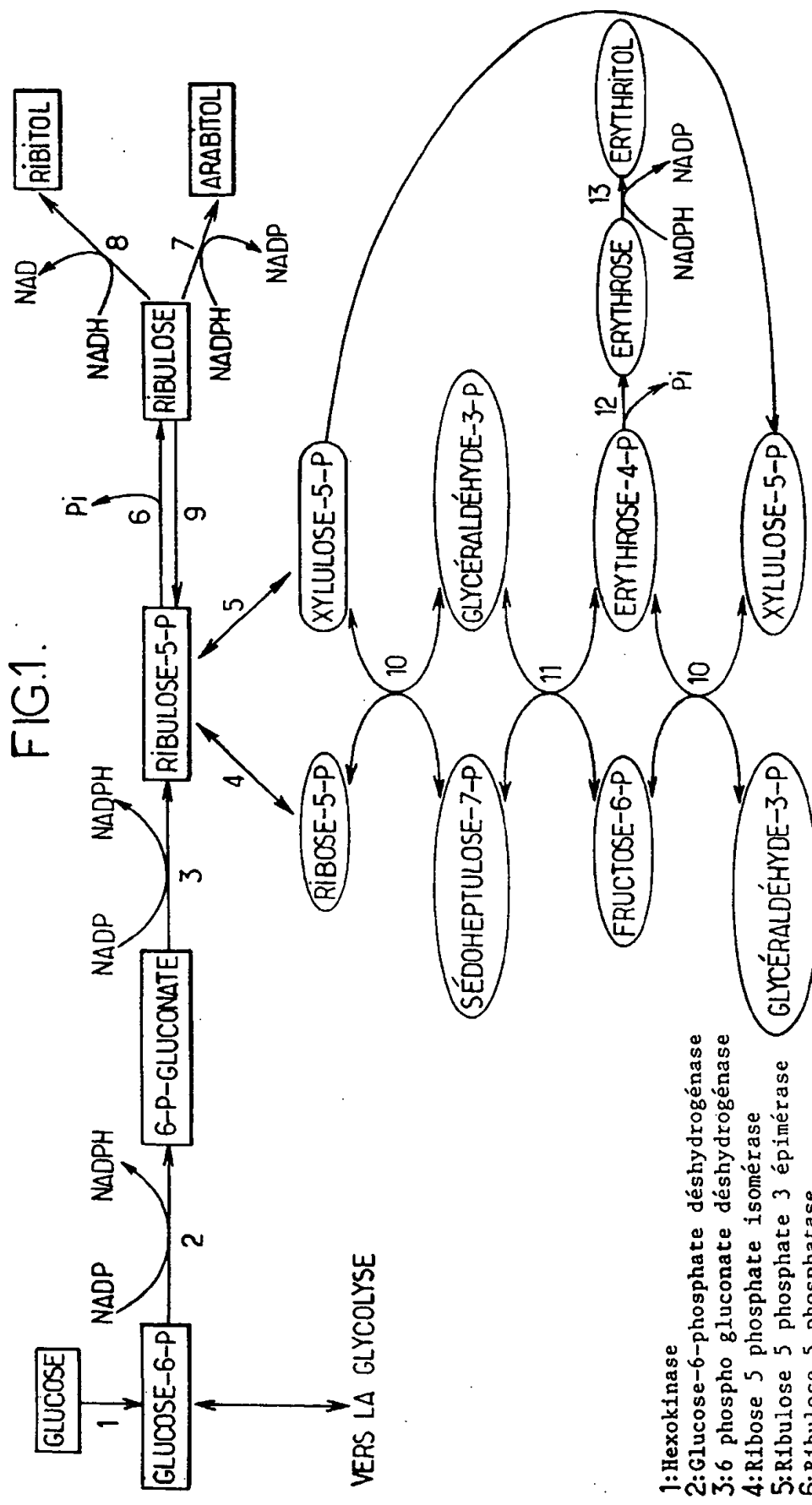
7. Souche osmotolérante selon l'une ou l'autre des revendications 5 et 6, caractérisée par le fait que l'activité enzymatique de la ribulose réductase NADPH spécifique est éliminée ou sensiblement réduite.

8. Souche osmotolérante selon l'une ou l'autre des revendications 5 et 6, caractérisée par le fait que les activités enzymatiques des ribuloses réductases NADPH et NADH spécifiques sont éliminées ou sensiblement réduites.

9. Souche osmotolérante selon la revendication 8, caractérisée par le fait qu'une activité enzymatique du type érythrose réductase a été introduite dans la souche.

10. Séquence d'ADN, correspondant à une partie du gène codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Yamadazyma ohmeri*, telle que décrite sur la Figure 2.





2/6

SEQUENCE NUCLEIQUE DU FRAGMENT PCR GPD42 ET DE LA  
SEQUENCE EN ACIDES AMINES DEDUITE

1  
TTG CGT TTT GGC AAC CAC ATG TTC AAT GGT CTC TGG AAC AAA  
L R F G N H M F N G L W N K  
  
AAC CAT ATC AAC TCC ATC CAC ATT TCT TTC AAG GAT AAG TTT  
N H I N S I H I S F K D K F  
  
GGT ACT GAA GGT ATA AGT GGT TAT CTC CAA GAA ATT GGT ATT  
G T E G I S G Y L Q E I G I  
153  
GTT CGT GAC GTG ATG CAG AAC CAC CT  
V R D V M Q N H L

FIG.2.

FIG. 3.

S.C FDS ICEH R D W C N T T L Q I M T L L T M R P V S F D P E S I R D E K V K V L K A V

P.O L Q E I C E H R D W C N T T L Q I M T L L T M R P V S F D P E S I R D E K V K V L K A V

[illegible]

FIG.4.

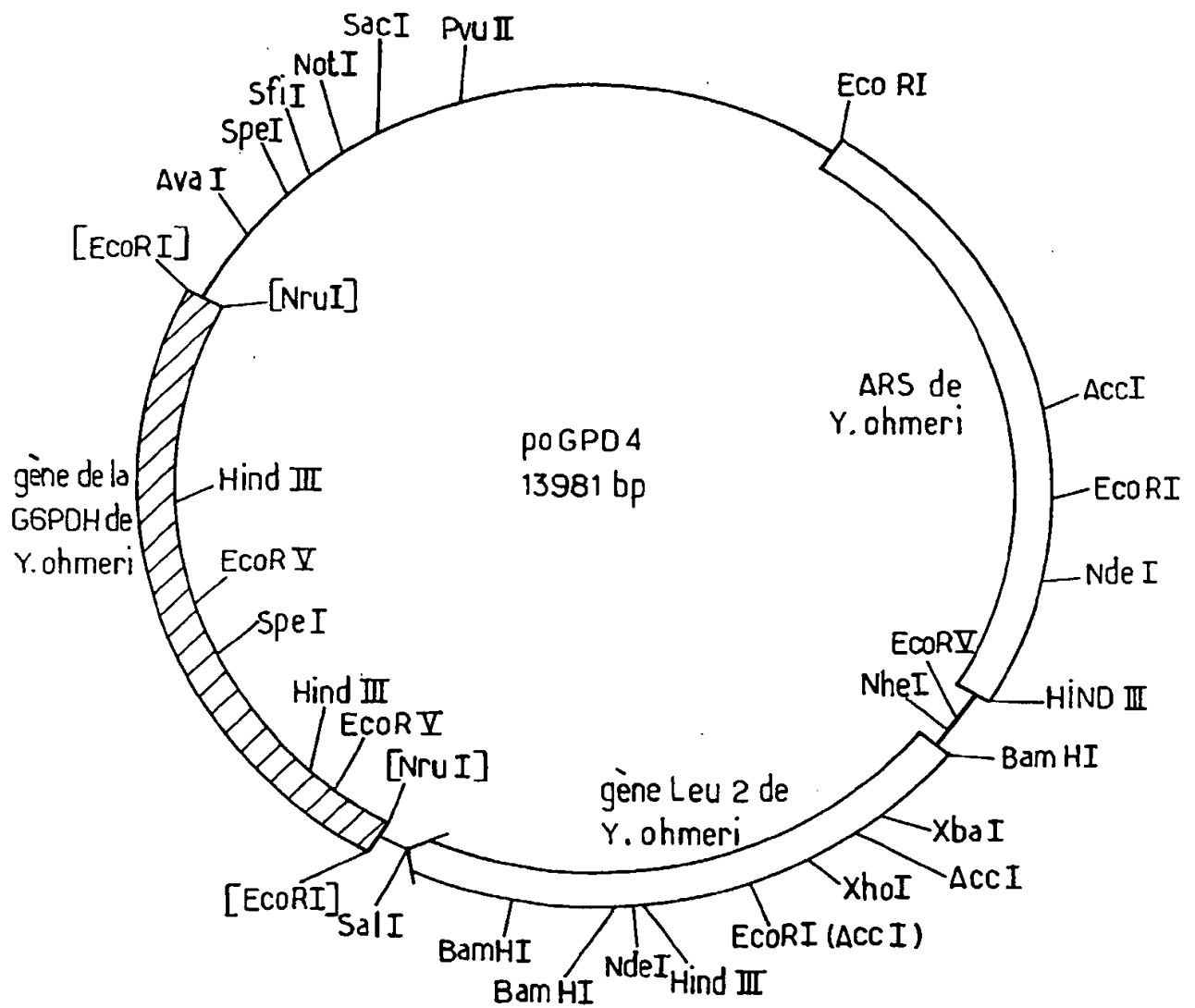


FIG.5.

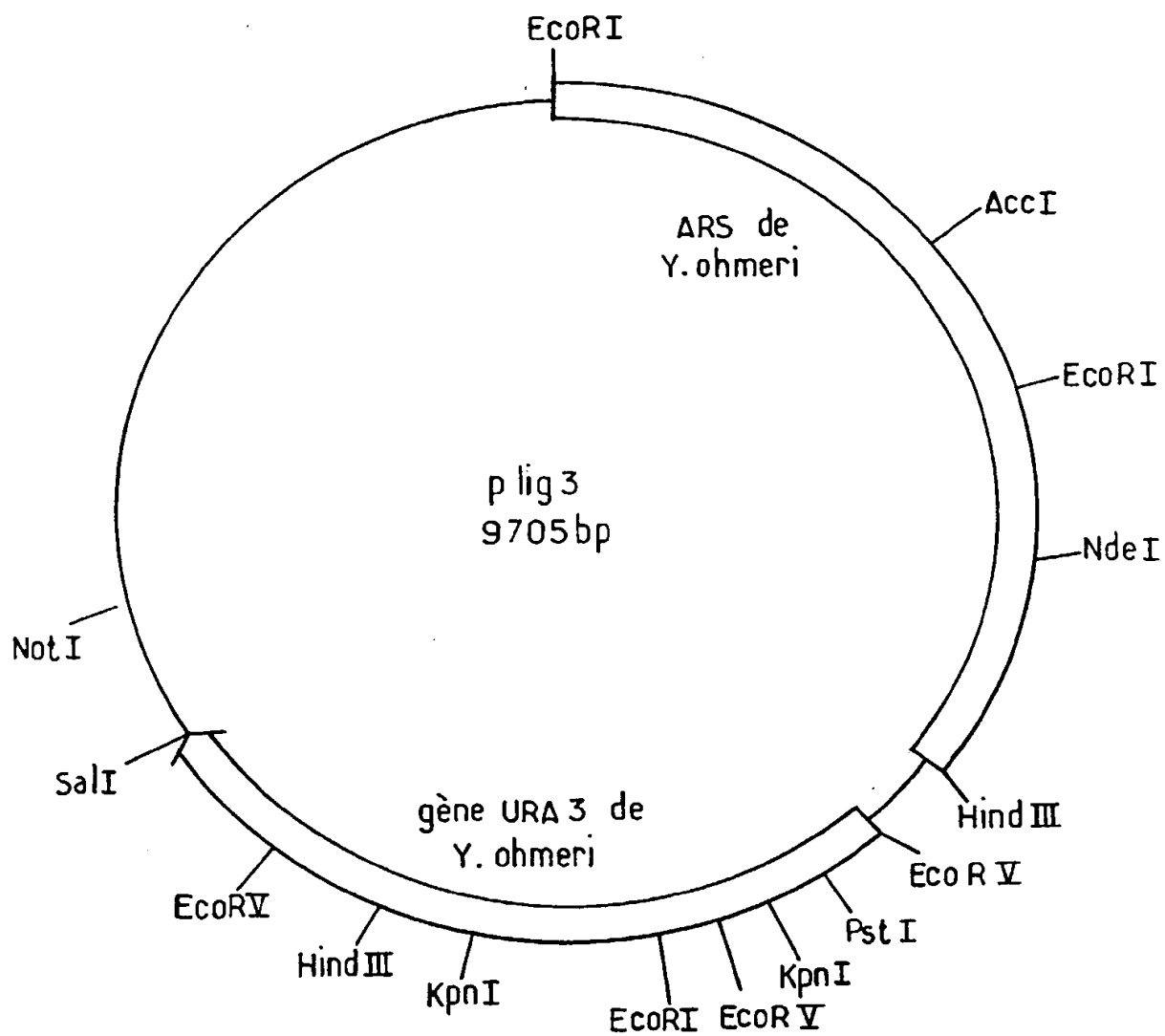
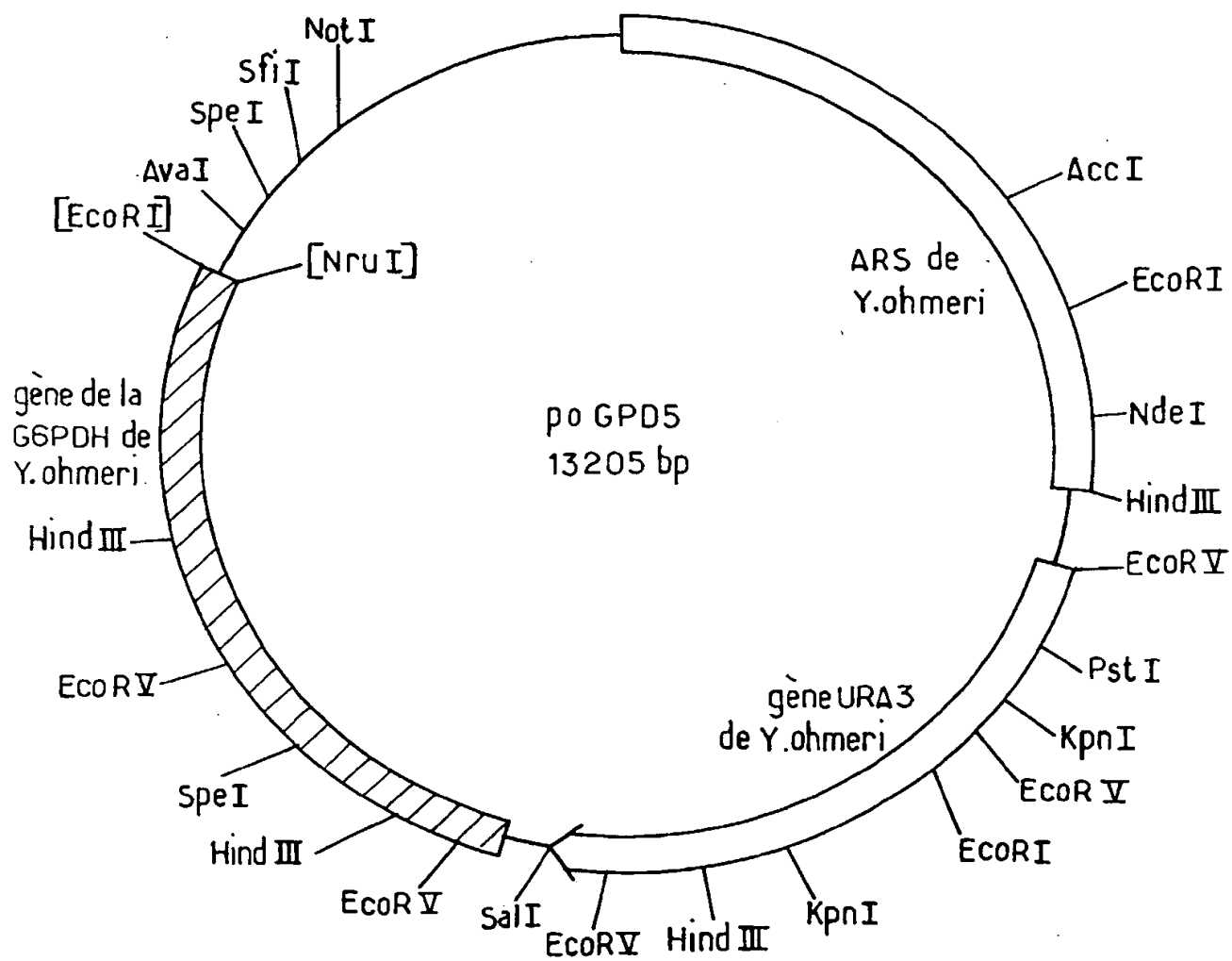


FIG. 6.



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 551903  
FR 9716138

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 5 631 150 A (XYROFIN OY; HARKKI AM; MYASNIKOV AN; APAJALAHTI JHA; PASTINEN OA (FI) ) 20 mai 1997 * colonne 3, alinéa 3 * * colonne 5, alinéa 8 - colonne 6, alinéa 1 * * colonne 7, ligne 14-16 * * colonne 8, ligne 3-17 * * colonne 11, alinéa 6 * * colonne 13, alinéa 2 * * colonne 25 - colonne 27; exemple 8 * * colonne 31; exemple 13 * ---	1,5,6
A	FR 2 009 331 A (EISAI KABUSHIKI KAISHA (JP)) 30 janvier 1970 * le document en entier * ---	1,6
A	JEFFERY J. ET AL.: "Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Structure-function relationships and the Pichia jadinii enzyme structure" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 212, no. 1, février 1993, pages 41-49, XP002077140 * page 42 - page 43; figure 1 * ---	10
A	PIREDDA S. ET AL.: "Development of a transformation system for the yeast Yamadazyma (Pichia) ohmeri" YEAST, vol. 10, no. 12, novembre 1994, pages 1601-1612, XP002059304 -----	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
10 septembre 1998		Macchia, G
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**